

B29

⑩ 日本国特許庁 (J P)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭63-267296

⑬ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和63年(1988)11月4日

C 12 P 21/02

A 61 K 37/02

ADU

F-6712-4B

ADY

8615-4C

G-7252-4C

C 07 K 45/02

13/00

15/26

C 12 N 15/00

/(C 12 P 21/02

C 12 R 1:19)

(C 12 P 21/02

C 12 R 1:91)

8318-4H

A-8412-4B

審査請求 未請求 発明の数 2 (全18頁)

⑮ 発明の名称 インターフェロン結合体およびその製造方法

⑯ 特 願 昭62-56676

⑰ 出 願 昭62(1987)3月13日

優先権主張 ⑱ 昭61(1986)3月14日 ⑲ 日本(J P) ⑳ 特願 昭61-54650

㉑ 昭61(1986)12月26日 ㉒ 日本(J P) ㉓ 特願 昭61-308693

㉔ 発 明 者 田 中 利 明 神奈川県鎌倉市手広1111番地 東レ株式会社基礎研究所内

㉕ 発 明 者 河 野 源 神奈川県鎌倉市手広1111番地 東レ株式会社基礎研究所内

㉖ 発 明 者 沢 田 律 子 神奈川県鎌倉市手広1111番地 東レ株式会社基礎研究所内

㉗ 出 願 人 東 レ 株 式 会 社 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号

明 細 書

1. 発 明 の 名 称

インターフェロン結合体およびその製造方法

2. 特許請求の範囲

(1) β 型インターフェロンと γ 型インターフェロンを連結してなるインターフェロン結合体。

(2) β 型インターフェロンと γ 型インターフェロンを連結してなるインターフェロン結合体を暗号化する塩基配列を含み、その前部に該結合体の発現のための制御部位を暗号化する塩基配列を有する組換え体DNAにより形質転換された形質転換体を培養し、インターフェロン結合体を生成せしめ、該培養物よりインターフェロン結合体を単離精製することを特徴とするインターフェロン結合体の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は医薬品あるいは試薬として用いることができる、 β 型インターフェロンと γ 型インターフェロンとを連結してなるインターフェロン結合

体およびその製造方法に関する。

[従来の技術]

インターフェロンは抗腫瘍作用、抗ウイルス作用をはじめとする多面的生物活性を有するタンパク質であり、その臨床応用が注目を集めている。インターフェロンはその誘導物質、産生細胞あるいは抗原性により α 、 β 、 γ 型の三種に分類されるが、それぞれ遺伝子の構造、タンパク質としての物性、生物活性に違いのあることが知られている〔小林茂保編“インターフェロンの科学”講談社(1985)〕。

β 型インターフェロン(IFN- β)はおもに線維芽細胞をウイルスや二重鎖RNAなどの核酸を用いて誘発し、産生される糖タンパク質であり、pH2処理に安定、56℃処理に不安定な性質を有する。 β 型インターフェロンを暗号化する遺伝子はすでに単離され〔Taniguchi ら(1979) Proc. Jpn. Acad. 55, Ser. B, 464-468〕、塩基配列およびアミノ酸配列が明らかにされており、さらに得られたcDNAを利用して、大腸菌を宿主

BEST AVAILABLE COPY

とする生産系が開発されている(Taniguchi ら (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5230-5233 ; Goeddel ら (1980) Nucleic Acids Res. 8, 4057-4074 ; Derynck ら (1980) Nature 287, 193-197) .

γ 型インターフェロン (IFN- γ) はおもに Tリンパ球をマイトジェン処理することにより誘発される糖タンパク質であり、pH2 処理に対し不安定な性質を有する。 γ 型インターフェロンについても暗号化する遺伝子が単離され塩基配列が明らかにされるとともに、大腸菌を用いた生産系が構築されている (Devos ら (1982) Nucleic Acids Res. 10, 2487-2501 ; Gray ら (1982) Nature 295, 503-508) . また天然型についてアミノ酸配列が報告されている (Rinderknecht ら (1984) J. Biol. Chem. 259, 6790-6797) .

α 、 β 、 γ 型インターフェロンの中で、 α 、 β 型は従来 I 型インターフェロンと呼ばれていたもので、アミノ酸配列で 29% の一致を示し高い構造類似性が示唆されており (Taniguchi ら (1980)

Gene 10, 11-15)、さらにその認識するレセプターも同じであるといわれている。このため α 、 β 型共存下での作用は相加的である。これに対し γ 型インターフェロンは従来 II 型と呼ばれていたものであり、I 型とのアミノ酸配列類似性は低く、その認識するレセプターも異なるといわれている (Branca ら (1981) Nature 294, 768-770) . そのため I 型、II 型ではそれぞれの示す抗ウィルススペクトル、抗細胞増殖効果のスペクトルは異なっており (小林茂保編 "インターフェロンの科学" 講談社 (1985) 22-68) また両作用において相乗効果を示すことが認められている (Czarniecki ら (1984) J. Virol. 49, 490-496 ; Fleishmann Jr. ら (1984) J. IFN. Res. 4, 265-274 , 特開昭59-98019) .

インビトロにおいては既存の β 、 γ 型インターフェロンを混合すればこの相乗作用が示されるが、インビボにおいてはそれぞれのインターフェロンの体内動態の異なることが予測され、二種のインターフェロンがその作用部位に存在するかどうか

は疑問があり、すなわちインビトロで示される相乗作用がインビボで示されるかについて疑問視される。

上記の欠点を解消するため β 、 γ 型インターフェロンを一つのポリペプチドに連結させ、 β 、 γ 型混合物による相乗作用を単独のポリペプチドに発揮させることができれば、体内動態の問題も解消され有用なことから考えられる。またこのような連結されたインターフェロンは一つのポリペプチドに元の β 、 γ 型インターフェロン混合物の相乗作用を示すため、分子あたりの作用が天然に存在するインターフェロンより増強されることとなり、作用の強いインターフェロンを得ることが可能と考えられる。

また異なる作用スペクトルを持つ β 、 γ 型インターフェロンの活性を一つのポリペプチドに表現させれば、作用スペクトルの広いポリペプチドを作製することができると考えられる。しかしまだこのような β 、 γ 型インターフェロンを一つのポリペプチドに連結させる試みは成されていない。

元来二つの異なる作用をしていたポリペプチドを結合させ、一つのポリペプチドに元に二つの機能を持たせる例はすでに知られている (Youno ら (1970) Nature 228, 820-824 ; Neuberger ら (1984) Nature 312, 604-608 ; Bulow ら (1985) Biotechnology 3, 821-823) . また、インシュリンを連結しポリペプチドの安定化をはかった例も報告されている (Shen, Shi-Hsiang (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 4627-4631) . 他の例として γ 型インターフェロンとインターロイキン-2 を連結、一つのポリペプチドに表現し、両活性を発現させた例が開示されている (特開昭60-241890) . しかしながら β 、 γ 型インターフェロンを一つのポリペプチドに発現させ、作用スペクトルが広く、かつ作用の強いインターフェロンを製造した例はまだ知られていない。(発明が解決しようとする問題点)

本発明は、従来 β 型インターフェロン、 γ 型インターフェロンとして独立に産生されていたインターフェロンポリペプチドを一つのポリペプチド

に連結し、 β 、 γ 型インターフェロンがそれぞれ保持していた抗ウイルス作用、抗細胞増殖作用などの生物活性を単独のポリペプチドで発揮する作用スペクトルの広いインターフェロン結合体を製造するものであり、かつ、 β 、 γ 型インターフェロン混合体の示す相乗作用を単独のポリペプチドで発揮する作用の強力なインターフェロン結合体を提供するものである。

〔問題を解決するための手段〕

本発明は β 型インターフェロンと γ 型インターフェロンとを連結してなるインターフェロン結合体、および該結合体を暗号化する塩基配列を有し、該結合体の発現のための制御部位を付加した組換え体DNAによる形質転換体を用いた該結合体の製造方法に関する。

本発明における β 型インターフェロン、 γ 型インターフェロンとは、それぞれのインターフェロン特有の活性を有するものであれば全てを包含する。そのポリペプチド部分は、たとえば γ 型インターフェロンにおいては、N末端にアミノ酸残基

が三残基付加されたもの〔Grayら(1982) Nature 295, 503-508〕や、C末端部の欠損しているもの〔Roseら(1983) Biochem. J. 215, 273〕が知られているが、このようにアミノ酸残基が付加あるいは欠損しているものも本発明に含まれる。またアミノ酸残基の一部置換した γ 型インターフェロンも開示されているが(特開昭59-93093号公報、特開昭59-167596号公報)、それぞれのインターフェロン特有の活性を有しておればこれらも本発明に包含される。好ましくは、 β 型インターフェロンについては第1図に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドがよく、 γ 型インターフェロンについては第2図のものがよい。

これら β 、 γ 型インターフェロンの連結順序は特に限定しない。すなわち、 β 型のポリペプチドが新しい結合ポリペプチドのN末端側に、 γ 型がC末端側に配置されてもよいし、またその逆でもよい。

β 、 γ 型インターフェロンの連結部位について、

β 、 γ 型のポリペプチドを直接連結してもよいし、両者の間にスペーサーペプチドを介して連結してもよい。スペーサーペプチドを介して酵素を連結した例として、 β -ガラクトシダーゼのサブユニットを連結した例が報告されているが〔Kushinokura(1985) EMBO J. 4, 1067-1073〕、この例に示されるように親水性のアミノ酸残基を多く含むポリペプチドにより連結されることが好ましい。さらにスペーサーとしては、自然界に存在するタンパク質のドメイン間を繋ぐポリペプチドを利用することもできる。スペーサーペプチドは通常アミノ酸の数が50以下のものが用いられ、好ましくはイムノグロブリン分子のスイッチペプチドと呼ばれるペプチドがよく、さらにThr-Gln-Leu-Gly-Glu-Pro-Lys-Ala-Ala-Lys-Ser-Val-Thrで示されるペプチドが好ましい。

本発明では、 β 型インターフェロンと γ 型インターフェロンとを連結してなる構造体をインターフェロン結合体と呼ぶ。特にN末端側に β 型インターフェロン、C末端側に γ 型インターフェロンのポ

リペプチドを連結したものをインターフェロン β γ 結合体(IFN- $\beta\gamma$)とし、その逆をインターフェロン $\gamma\beta$ 結合体(IFN- $\gamma\beta$)と呼ぶ。また各インターフェロンの連結部にスペーサーペプチドを含むものをそれぞれインターフェロン β c γ 結合体(IFN- β c γ)あるいはインターフェロン γ c β 結合体(IFN- γ c β)と呼ぶこととする。

インターフェロン結合体を得る手段としては、有機合成によりアミノ酸を付加し合成する方法、遺伝子操作の手法を用いて、DNAレベルで目的のポリペプチドを発現するよう設計し、適当な形質転換体により発現させる方法がある。本発明において、目的のポリペプチドを得るための方法は特に限定されるものではないが、遺伝子操作の手法を用いた方がより容易に目的のポリペプチドを得ることができるため好ましい。

遺伝子操作の手法を用いてインターフェロン結合体を得るためには、それぞれの β 、 γ 型インターフェロンを暗号化する塩基配列を直接あるいは

スパーサーペプチドを暗号化する塩基配列を介して連結した構造を持つDNAに、発現のための適当な制御部位を結合することにより組換え体内での発現が達成される。

インターフェロン結合体を暗号化する塩基配列としては、目的のポリペプチドを暗号化するものであれば特に限定されない。すなわち、あるアミノ酸に対するコドンが複数個存在する場合、いずれを用いてもかまわない。好ましくは β 型あるいは γ 型インターフェロンcDNAの塩基配列〔Taniguchi ら(1980) *Gene* 10, 11-15 ; Devos ら(1982) *Nucleic Acids Res.* 10, 2487-2501〕に一致することが好ましい。インターフェロン結合体を暗号化する塩基配列を得る手段としてDNA合成による方法、あるいは β 、 γ 型インターフェロンを暗号化する遺伝子を取り出し連結する方法が行い得るし、両者を組み合わせた方法でもよい。DNA合成により目的の塩基配列を得る方法は、すでに報告されている手法〔Edge ら(1981) *Nature* 292, 756-762 ; Tanaka ら(1983) *Nu*

cleic Acids Res. 11, 1707-1723〕に従えば達成される。 β 型あるいは γ 型インターフェロンを暗号化する遺伝子としては、いわゆる染色体上の遺伝子とcDNAを用いることができるが、cDNAを用いる方が好ましい。それぞれのcDNAは公知の方法に従って単離することができる〔Taniguchi ら(1979) *Proc. Jpn. Acad.* 55, Ser. B, 464 ; Goeddel ら(1980) *Nucleic Acids Res.* 8, 4057-4074 ; Derynck ら(1980) *Nature* 287, 193-197 ; Devos ら(1982) *Nucleic Acids Res.* 10, 2487-2501 ; Gray ら(1982) *Nature* 295, 503-508〕。また、これらの文献から公知の塩基配列の一部をプローブとして、公知の方法〔Okayama ら(1983) *Molecular and Cellular Biology* 3, 280〕により調製したcDNAライブラリーよりコロニーハイブリダイゼーションにより選択し得ることもできる。

これらのcDNA配列からインターフェロン結合体を暗号化する塩基配列を得るには、それぞれのcDNAを適当な制限酵素により消化した後、

そのまま、あるいはマングビーンヌクレアーゼやDNAポリメラーゼIのクレノウ断片、T4 DNAポリメラーゼなどによって平滑末端を形成させた後結合すればよい。好ましくは制限酵素処理により欠失したポリペプチドを暗号化する塩基配列を合成DNAにより補ってFcDNAを連結すれば、完全な長さの β 型インターフェロンと γ 型インターフェロンポリペプチドが連結されることになりよい。また、この時スパーサーペプチドを暗号化する塩基配列を両構造遺伝子の間に挿入しておくこともできる。また連結の他の方法として、あらかじめ β 、 γ 型インターフェロンの構造遺伝子の5'あるいは3'末端部位に合成DNAを利用する手法により〔Goeddel ら(1979) *Nature* 281, 544-548〕制限酵素部位を導入しておき、それらを消化、平滑末端化などの処理後、両構造遺伝子を連結してもよい。要は β 、 γ 型インターフェロン構造遺伝子の読み取り相が一致して連結されればどのような方法でもよい。

上記のインターフェロン結合体を暗号化する塩

基配列を利用してポリペプチドを生産させるには、動植物細胞、酵母、大腸菌が用いられる。大腸菌内で前記の塩基配列よりポリペプチドを発現させるためには、転写開始のためのプロモーター配列および翻訳のためのSD配列、ATGコドンをその前部に付与する必要がある。プロモーター配列としては、*lac*、*trp*、*recA*などの遺伝子のプロモーターが知られているが、プロモーターとしての活性を有する配列であればどのようなものでもよい。好ましくは*trp*プロモーターのような強いプロモーターを用いることがよい。SD配列はリボゾームRNAの結合部位であり、翻訳には必須の部位である。本発明においてはSD配列についても特に限定するものではない。このように構成されたポリペプチド発現のための制御部位に翻訳のための信号ATGコドンを付与したインターフェロン結合体を暗号化する塩基配列を連結することによりポリペプチド発現は達成される。ATGコドンの付与は公知の方法〔Goeddel ら(1979) *Nature* 281, 544-548〕に従い合成DN

Aを用いて行い得る。また、 β 型インターフェロンの場合は公知の方法〔Taniguchi ら(1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 5230-5233〕によりATGコドンを出し得る。

ここで得られたDNAを宿主に導入するには、ベクターDNAを利用する。大腸菌で用いられるベクターDNAとしてはpBR322、pSC101などに代表されるプラスミドDNA、および入ファージのようなファージDNAが挙げられるがいずれをも用い得る。このベクターDNAと前記のインターフェロン結合体を発現するよう構成されたDNAを連結し、公知の方法〔Hanlatisら "Molecular cloning" Cold Spring Harbor Laboratory (1982) p250-255〕に従い、大腸菌とDNAを接触させれば形質転換体を得ることができる。

形質転換された大腸菌株について、天然培地、半合成培地、合成培地を用いて培養することによりインターフェロン結合体の生産は達成される。ここでの培養には液体培地が適しており、好まし

くは、たとえば発現系にもr pプロモーターを用いた場合には、インドールアクリル酸を培養途中に加え、インターフェロンの生産を誘導することがよい。他のプロモーターを用いる場合も、それぞれ特有の誘導剤を用いることが好ましく、これによりインターフェロン結合体の生産量は増大する。

以上のごとく得られたインターフェロン結合体を生産する大腸菌を公知の方法〔堀江武一、山下仁平編集：「蛋白質・酵素の基礎実験法」南江堂(1981) 3-7〕、たとえば酵素処理、超音波処理、播浪法、加圧処理などにより破砕することにより粗インターフェロン結合体抽出液が得られる。グアニジン塩酸塩、尿素などによる処理〔Davis ら(1983) *Gene* 21, 273-284〕と組み合わせれば抽出効率は向上し好ましい。

さらに得られた粗抽出液から公知の方法〔堀江武一、山下仁平編集：「蛋白質・酵素の基礎実験法」南江堂(1981) 18-382〕、たとえば塩析、限外濾過、イオン交換、ゲル濾過、アフィニティ

ークロマトグラフィー、電気泳動等の方法、あるいはこれらを組み合わせることによって、高純度のインターフェロン結合体を得ることができる。

動物細胞を用いてインターフェロン結合体を発現させるには、動物細胞内で機能するプロモーターの制御下にインターフェロン結合体を暗号化する塩基配列を配置する必要がある。動物細胞内で機能するプロモーターの例として、SV40初期プロモーター、SV40後期プロモーター、HBウイルス遺伝子のプロモーター、MMTVプロモーター、チミジンキナーゼ遺伝子のプロモーター、メタロチオネイン遺伝子のプロモーター、熱ショック蛋白のプロモーター、インターフェロン遺伝子のプロモーターが挙げられる。これらプロモーターの制御下に、大腸菌の場合と同様の方法でインターフェロン結合体を暗号化する塩基配列を連結すればよい。プロモーターは一種でも二種以上併用してもよい。なお、真核細胞型プロモーターの上流に、転写効率を高めると言われているHarbeyマウス肉腫ウイルスの5'LTRのエンハンサ

ー配列やSV40のエンハンサー配列を挿入してもよい。好ましくは、細胞外分泌のためのシグナルペプチドを暗号化する塩基配列を、インターフェロン結合体を暗号化する塩基配列の前部に付加しておけば、ポリペプチドは培養上清に生産される。

ここで得られたDNAを動物細胞に導入するため大量に調製するには、大腸菌における複製開始点と薬剤耐性因子を連結しておくことが有用である。複製開始点としては、コリシンE1プラスミド由来のもの、たとえばpBR322およびこれに類縁のプラスミドが望ましいが、これに限定されるものではない。薬剤耐性遺伝子としては、アンピシリン耐性、テトラサイクリン耐性、カナマイシン耐性などを担う遺伝子が例として挙げられる。また、宿主細胞内での自律増殖が可能な複製開始点、たとえばSV40、ポリオマウイルスの複製開始点を連結しておくことよい。これらのDNA断片を連結しインターフェロン結合体発現ベクターが得られる。

ベクターDNAの調製は一般的な方法で行うことができる(T. Maniatis et al, Molecular Cloning, p86~96, 1982)。

ベクターDNAを導入する動物細胞としては、ヒト、サル、チャイニーズハムスター、マウス等の細胞を用いることができるが、目的物がヒトインターフェロン結合体である場合にはヒト細胞を用いることが望ましい。ヒト細胞としては、産生される糖付加ポリペプチドで増殖阻害のかからないものが用いられる。好ましいヒト細胞は、ヒト肺癌由来細胞、特にPC8およびPC12(H. Kijino et al, Br. J. Cancer, 39, 15, 1979)である。

ベクターDNAの細胞への導入は公知のリン酸カルシウム法により行うことができる(F. L. Graham et al, Virology, 54, 536, 1973)。

インターフェロン結合体発現プラスミドが導入された細胞株を得るには、たとえばこのベクターをG418耐性遺伝子発現ベクターpSV2neo(P. J. Southern et al, J. Mol. Appl. Genet., 1, 327, 1982)あるいはpNEO5(H. Lusk et

al, Coll., 36, 391, 1984)とともに導入すれば、形質転換されなかった細胞が生き残れないG418を含む選択培地で生育できるため容易に識別できる。

以上のようにして得られた形質転換体を、たとえば牛胎児血清を含む培地で培養すればインターフェロン結合体は培養上清に回収され、先に述べた方法により精製される。このようにして得られるインターフェロン結合体は糖鎖を伴うポリペプチドである。

上記の操作により得られたインターフェロン結合体は、抗ヒト β 型インターフェロン抗体、抗ヒト α 型インターフェロン抗体と結合することから、両者の抗原性を有している。また各々の抗体による中和試験から、 β 、 α 型インターフェロン両方の活性を一つのポリペプチドで表現していることが示されている。

(実施例)

以下に本発明の具体的な実施例を示す。実施例中に示される基本的な遺伝子操作の手法は、“Ho-

lecular cloning”(Maniatisら(1982) Cold Spring Harbor Laboratory)に従った。

本発明の具体例を示す前に、本発明の構成のために必要なヒト β 型インターフェロン、ヒト α 型インターフェロン発現プラスミドについて参考例として簡単に述べる。

参考例

(1) ヒト β 型インターフェロン発現プラスミドpKM6:

すでに報告されている方法(谷口(1982)生化学54, 363-377)に従い作製したヒト β 型インターフェロン発現プラスミドpTUIFN β -5をHind III消化後、T4 DNAポリメラーゼのクレノウ断片処理により平滑末端とし、Bgl IIリンカーを連結、Bgl II消化した後、T4 DNAリガーゼを用いて自己環化させプラスミドpYO-10を得た。pYO-10をSal I、Cla I消化し、アガロースゲル電気泳動により約830bpのDNA断片を分取した。このDNA断片を特開昭61-19487号公報に記載されてい

るプラスミドp6hu α -A2のCla I-Sal I部位間に挿入した構造を持つプラスミドがpKM6である。(第3図)

(2) ヒト α 型インターフェロン発現プラスミドp6hu α -N1:

ヒト扁桃由来リンパ球をPHA(フィトヘモグルチニン)とTPA(12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate)で処理し、ヒト α 型インターフェロン生産を誘導した後(Vilcekら(1983) Infection and Immunity 34, 131)、細胞よりmRNAを調製した。mRNAの調製とcDNAの調製およびプラスミドへのクローニングは、公知の方法(Okayamaら(1983) Molecular and Cellular Biology 3, 280)に従った。得られたcDNAライブラリーの中から、公知のヒト α 型インターフェロン構造遺伝子(GoeddelらNature(1982) 295, 503-509)の3'末端近傍に対応する5'-AGGACAACCATTACT-3'の配列を有する合成DNAをプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションを行い、ヒト α 型インターフェロ

ンcDNAを有するプラスミドpIFN- α 15を得た。次にpIFN- α 15をNde I、BamHI消化後、アガロースゲル電気泳動により約0.9kbのDNA断片を分取した。また5'-CGATGCAGGACCCA-3'、5'-TATGGGTCCTGCAT-3'のDNAオリゴマーを合成し、5'末端をT4ポリヌクレオチドキナーゼを用いてリン酸化した後、それぞれ約8pmole/ μ lとなるように混合し、65℃、3分間加熱、急冷した後、再度65℃で3分間加熱し、室温に放置することにより徐々に冷却させ、アニーリングを行った。このDNAオリゴマー7pmole、pIFN- α 15のNde I-BamHI断片0.3pmole および(1)で示したpKM6を、Cla I、BamHI消化後アガロースゲル電気泳動により分取した約4200bpのDNA断片0.1pmoleを混合し、T4DNAリガーゼを用いて連結した後、E. coli MC1061 [CasadabanらJ. Mol. Biol. (1980) 138, 179-207]を形質転換した。アンピシリン耐性で選択した形質転換株について、

(4) p6hu α N1-CKpnの作製:

プラスミドp6hu α N1-CKpnの構造を第6図に示す。p6hu α N1をCla I、BamHI消化し、アガロースゲル電気泳動により約4200bpのDNA断片と、約1050bpのDNA断片を分取する。1050bpのCla I-BamHI断片をさらにHinf I消化し、アガロースゲル電気泳動により400bpのDNA断片を分取した。約4200bpのCla I-BamHI断片、400bpのCla I-Hinf I断片と(2)に示した方法に準じて6本のDNAオリゴマーより作製した下に示すDNAアダプター

AGTCAGATGCTGTTTCGCGGTCGACGTGCATCCCAG

GTCTACGACAAAGCGCCAGCTGCACGTAGGGTC

GTACCATGAGATCTG

CATGGTACTCTAGACCTAG

を混合連結し、E. coli MC1061を形質転換した。アンピシリン耐性を示す形質転換株について、5'-GATCCAGATCTCATGをアプローブと

5'-TATGGGTCCTGCAT-3' DNAオリゴマーをアプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションを行い、ヒト α 型インターフェロン発現プラスミドp6hu α N1(第4図)を得た。

次に β および γ 型インターフェロンcDNAを連結するために、それぞれの構造遺伝子の5'末端、3'末端に制限酵素部位を導入したプラスミドを作製した。

(3) pKM6-cxhoの作製:

プラスミドpKM6-cxhoの構造を第5図に示す。pKM6をBst E II、BamHI消化し、(2)に示した方法に準じて作製したアダプターDNA

GTTACCTCCGAAACTCGAGCTGA

GAGGCTTTGAGCTCGACTCTAG

を連結し、プラスミドpKM6-cxhoを得た。pKM6-cxhoをxho I消化し突出した塩基を削りとることにより、ヒト β 型インターフェロンのC末端アミノ酸アスパラギンを暗号化するAACが露出されることになる。

してコロニーハイブリダイゼーションを行ったところ、118株中4株が陽性を示し、これらはプラスミドp6hu α -CKpnを保持していた。p6hu α -CKpnをKpn I消化し突出した部分を削ることにより、ヒト α 型インターフェロンのC末端アミノ酸グルタミンを暗号化するCAGが露出されることになる。

(5) p6hu α N1 Δ BS-NHinの作製:

プラスミドp6hu α N1 Δ BS-NHinの構造を第7図に示す。p6hu α N1をBst E II消化し、得られた粘着末端をDNAポリメラーゼIのクレノウ断片を用いて平滑末端とした後、Sal Iリンカーを連結、Sal I消化した後、T4DNAリガーゼを用いて自己環化させ、プラスミドp6hu α N1- Δ BSを得た。次にpKM6をEcoRI、Sal I消化し、アガロースゲル電気泳動により約3700bpのDNA断片を分取し、さらに別にp6hu α N1- Δ BSをNde I、Sal I消化し、アガロースゲル電気泳動により約800bpのDNA断片を分取した。

これら2種のDNA断片と(2)の方法に準じて作製した下記のDNAアダプターとを連結し、目的のプラスミドp6hu γ N1 Δ BS-NHln

AATTGCGCAGGACCCA

CGCGTCCTGGGTAT

を得た。p6hu γ N1 Δ BS-NHlnをHlnPI消化し突出部分を削ることにより、ヒト γ 型インターフェロンのN末端アミノ酸、グルタミンを暗号化するCAGを露出できる。

実施例1

インターフェロン γ ・ β 結合体発現プラスミドp\gamma β の作製

p\gamma β の作製方法を第8図に示す。プラスミドpKM6 30 μ gをClaI消化した後、マングビーンヌクレアーゼ15単位で37℃15分間反応し、粘着末端を平滑末端とした。これをさらにBglII消化した後、アガロースゲル電気泳動により約500bpのDNA断片を分取した。別にプラスミドp6hu γ N1-CKpnをKpnI消化した後、T4DNA

ポリメラーゼにより平滑末端を形成させ、さらにBamHI消化してアガロースゲル電気泳動により、約4800bpのDNA断片を取得した。それぞれのDNA断片を混合、T4DNAリガーゼにより連結し、E. coli HB101 (Boyerら(1969) J. Mol. Biol. 41, 459-472)を形質転換した。得られたアンピシリン耐性の形質転換体について、上記の操作で得たpKM6のClaI-BglII断片をニックトランスレーションによって³²Pラベル化したDNAをプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションを行ったところ、56株中6株が陽性を示した。これらの株についてプラスミドDNAを抽出し、制限酵素切断点地図を作製したところ、第8図に示す構造を持っていた。さらに代表株 γ β 6の保持するプラスミドDNAのSalI消化物をM13ファージに組み込みDNA塩基配列を決定したところ、IFN- γ とIFN- β の構造遺伝子が読み取り枠が一致して連結されており、目的のプラスミドp\gamma β を得た。また同時に形質

転換体E. coli HB101 (p\gamma β)を得た。

実施例2

インターフェロン β ・ γ 結合体発現プラスミドp\beta γ の作製

p\beta γ の作製方法を第9図に示す。プラスミドpKM6-cxho 20 μ gをxhoI消化した後、15単位のマングビーンヌクレアーゼで37℃15分間処理し、平滑末端を形成させた後、SalI消化した。これをアガロースゲル電気泳動にかけ、約4500bpのDNA断片を分取した。別にp6hu γ N1 Δ BS-NHln 30 μ gをHlnPI消化した後、30単位のマングビーンヌクレアーゼで37℃15分間処理し、さらにこれをSalI消化した後、アガロースゲル電気泳動により、約860bpのDNA断片を分取した。それぞれのDNA断片を混合、T4DNAリガーゼにより連結し、E. coli HB101を形質転換した。得られたアンピシリン耐性の形質転換株のうち、50

株についてp6hu γ N1-CKpnを作製する際に利用したDNAオリゴマー5'-AGTCAGATGCTGTTTCを用いてコロニーハイブリダイゼーションを行ったところ、28株が陽性を示した。代表株 β γ 31についてプラスミドDNAを単離し、制限酵素切断点地図を作製したところ、第9図の構造を示し、さらにBstEII-SalI断片をM13ファージにクローン化し、DNA塩基配列を調べたところ、IFN- β 、IFN- γ 構造遺伝子が読み取り枠を合わせて連結されており、p\beta γ を得た。また同時に形質転換体E. coli HB101 (p\beta γ)を得た。

実施例3

インターフェロン γ c β 結合体発現プラスミドp\gammac β の作製

p\gammac β の作製方法を第10図に示す。pKM6をClaI消化した後、さらにBglII消化し、アガロースゲル電気泳動により約500bpのDNA断片を分取した。別に

スペーサーベアチドを暗号化するDNA断片を(2)に示す方法に準じ、4本のDNAオリゴマーより作製した。このDNA断片の構造を第11図に示す。このDNA断片10pmoleと先に分離したpKM6のClaI-BglII断片、および実施例1に示したp6hu γ N1-CKpnより分離した約4800bpのDNA断片を混合、T4DNAリガーゼにより連結し、E. coli HB101を形質転換した。得られたアンピシリン耐性を示す形質転換株82株について、実施例1に示したプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションを行ったところ3株が陽性を示した。この3株よりプラスミドDNAを得出し、制限酵素地図を作製したところ、1株のみが目的の構造のプラスミドp\gammac β を保持していた。この時同時に形質転換体E. coli HB101(p\gammac β)を得た。

実施例4

培養とインターフェロン結合体の製造

この菌体を1mlのリゾチーム3mg、EDTA2mM、食塩30mM、グリセロール20%を含むトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)に懸濁し、氷中で60分間放置した。凍結融解を3回繰り返し、菌体を破砕した後、30000g、20分の遠心分離により細胞残滓を除去したものを活性測定用の標品とした。インターフェロンの抗ウイルス活性測定法は“インターフェロンの科学”〔小林茂保編(1985)講談社p13-20〕に示されている。F1細胞-シンドビスウイルスを用いたCPE₅₀阻示法を用いた。活性測定の際の標準品としては、NIH natural IFN- γ Gg23-901-530によって力価校正した組換え体により生産されたIFN- γ ラボリファレンスを用いた。活性測定の結果を表1に示す。参考のため、ヒト β 型インターフェロンを発現するプラスミドpKM6、およびヒト α 型インターフェロンを発現するプラスミドp6hu α -N1を保持するE. coli HB101株について、前記の操作により調製したインターフェロン粗抽出液の抗ウイルス

実施例1〜3で得られた形質転換体について、トリプトファン100 μ g/ml、アンピシリン100 μ g/mlを含むLB培地(バクトトリプトン1.0%、酵母エキス0.5%、食塩0.5%、グルコース0.1%、水酸化ナトリウムを用いてpH7.2に調整)に接種し、30℃で8時間培養し、これをグルコース1.0%、カザミノ酸1.0%を含むM9培地(リン酸1カリウム0.3%、リン酸2ナトリウム0.6%、塩化アンモニウム0.1%、食塩0.5%に別滅菌したビタミンB₁を1 μ g/ml、硫酸マグネシウムを1mMによるよう添加する)に10%接種し、25℃で培養を続ける。約10時間後にインドールアクリル酸を終濃度10 μ g/mlとなるように添加し、さらに8時間培養を続行した。この間グルコース切れとならないよう適宜40%グルコース溶液を添加し、またpHが6.0〜7.0に保たれるよう14%NH₄OH溶液を用いて調整した。その後2mlの培養液より10000g、4分の遠心分離により菌体を集菌、さらに生理食塩水で洗浄した後、

活性を示した。各々のプラスミド保持株はインターフェロンに特徴的な抗ウイルス活性を示した。

第1表

菌 株	抽出液あたりの抗ウイルス活性(U/ml)
E. coli HB101 (p <trp6huifn-<math>\gammacβ)</trp6huifn-<math>	3.9×10^4
E. coli HB101 (p <trp6huifn-<math>\betaγ)</trp6huifn-<math>	1.6×10^4
E. coli HB101 (p <trp6huifn-<math>\gammacβ)</trp6huifn-<math>	7.7×10^4
E. coli HB101 (pKM6)	3.1×10^5
E. coli HB101 (p6hu α -N1)	4.1×10^4

実施例5

分子量の測定

実施例4の方法に従って培養した菌液1mlより10000g、4分の遠心分離により菌体を集菌した。この菌体を500 μ lの2-メルカプトエ

タノール5%、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 2%を含む62.5mMトリス-塩酸緩衝液 (pH 6.8) に懸濁した後、沸騰水浴中で5分間加熱し、放冷した後に50μl のブロムフェノールブルー0.05%、グリセロール70%を含む62.5mMトリス-塩酸緩衝液 (pH 6.8) を添加し、電気泳動用のサンプルとした。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動はレムリの方法 [Nature 227 (1970) 680] に従った。ゲル濃度は15%を用い、マーカータンパク質としては、リゾチーム分子量14400、トリアシンインヒビター分子量21500、カルボニックアンヒドラーゼ分子量31000、オボアルブミン分子量45000、ウシ血清アルブミン分子量66200、ホスホリパーゼB分子量92500を用いた。泳動終了後のゲルをクマシーブリリアントブルーR250により染色し、タンパク質を検出した。同時に泳動したゲルについて、公知の方法 [田部、(1983) 細胞工學 2 1061-1068] を用いてニトロセルロース膜にタンパク質を移した後、第一抗体

として市販の抗ヒトβ型インターフェロンウマイムノグロブリンあるいは抗ヒトα型インターフェロンウマイムノグロブリンを用い、さらにペルオキシダーゼ標識したプロテインAと反応させることによりインターフェロン結合体の位置を決定した。上掲ウェスタンブロッティングの結果とマーカータンパク質の相対移動度の結果より、インターフェロン結合体の分子量はIFN-αβ、IFN-βαは共に約37000であり、IFN-αcβは約38000であった。すなわち、ヒトβ型インターフェロン (分子量約20000) とヒトα型インターフェロン (分子量約17000) が連結され、一つのポリペプチドとなっていることがわかった。

実施例 6

抗体による中和

実施例4に示す方法で調製したE. coli HB101 (p trp 6 hu IFN-αβ) からの粗インターフェロン抽出液を5%仔ウシ血清10mM Hepes (pH 7.3) を含むイーグ

ルMEM培地で5倍に希釈する。このインターフェロン液1mlに対し、同培地で50倍に希釈した抗IFN-βウサギ抗血清 (中和価2700U/ml)、あるいは抗IFN-αウサギ抗血清 (中和価2000U/ml) を1ml加え、37℃で30分間保温したものについて抗ウイルス活性を測定した。この時、対照として抗血清の代わりに培地のみを入れたもの、また各々の抗血清希釈液0.5mlずつ入れたものについても同様に測定した。結果を第2表に示す。

第 2 表

抗 血 清	抗ウイルス活性 (U/ml)
対照 (抗血清無添加)	6.0×10^3
抗IFN-β抗血清	1.3×10^3
抗IFN-α抗血清	1.7×10^3
抗IFN-β抗血清+	81
抗IFN-α抗血清	

各々の抗血清により活性が中和され、ヒトβ型あるいはα型インターフェロン両方の作用を持つ

ことが明らかとなった。また抗血清中和時にたとえば抗IFN-α抗血清を用いた場合、 6.0×10^5 U/mlを中和価20U/mlの抗血清で中和すると、 1.7×10^3 U/mlとなることから、このIFN-αβはIFN-β、IFN-αの相乗作用を現わしていることがわかった。

実施例 7

インターフェロンβcα発現プラスミドp trp 6 hu IFN-βcαの作製

p trp 6 hu IFN-βcαの作製方法を第12図に示す。プラスミドpKM6-cxho 20μgをxho I消化した後、15単位のマングベーンヌクレアーゼで37℃15分間処理し、平滑末端を形成させた後Sal I消化した。これをアガロースゲル電気泳動にかけ約4500bpのDNA断片を分取した。別にp6 hu αN1ΔBS-NHln 30μgをHlnPI、Sal I消化後、アガロースゲル電気泳動により約860bpのDNA断片を分取した。上記2つのDNA断片と実施例3に示す方法で得たスパーサーボ

リベアチドを略号化するDNA断片10 pmoleを混合、T4 DNAリガーゼにより連結し、E. coli HB101を形質転換した。得られたアンピシリン耐性を示す形質転換体204株について、実施例2に示したプローブ、およびスベーターポリペプチドを略号化するDNA断片作製の際に用いたDNAオリゴマー5'-CGTTACCGACTTAGCAをプローブとして、コロニーハイブリダイゼーションを行った。2株が陽性を示し制限酵素を用いた分析結果から、1株が目的のプラスミドp trp6 hu IFN- β c γ を保持していた。この時同時に形質転換体E. coli HB101 (p trp6 hu IFN- β c γ)を得た。実施例4の方法に従ってこの菌株を培養、菌体抽出液を作製し、抗ウィルス活性を測定した。抽出液あたり 3.9×10^4 U/mlの抗ウィルス活性が認められた。

実施例 8

抗体による中和

実施例6に示す方法により、E. coli H

- β 、抗IFN- γ 抗血清により活性が部分的に中和され、さらに両抗血清の存在により、ほぼ完全に活性は失われた。すなわち、IFN- γ c β はIFN- β 、IFN- γ の立体構造をとったものが1つのポリペプチドに連結されており、両者の活性を1つのポリペプチドで発揮していることがわかった。

また、IFN混液に見られる抗ウィルス作用に関する相乗作用をIFN- γ c β も同様に示しており、この分子が1分子でIFN- β 、IFN- γ の相乗作用を示すことを確認した。

実施例 9

A. ヒトインターフェロン β 発現ベクターpSV β の作製:

pSV β は、ヒトインターフェロン β 発現ベクターpSV2 $\frac{1}{2}$ IFN β (特開昭61-52283)から真核細胞での複製を阻害する配列(H. Lusky et al, Nature, 293, 79, 1981)を除去したベクターである。作製方法は以下の通りである。

まず、pSV2 $\frac{1}{2}$ IFN β のSV40初期プロモ

ーターB101 (p trp6 hu IFN- γ c β)からの粗インターフェロン抽出液について、抗体による中和を検討した。比較のため、組換え体により製造されたIFN- β 、IFN- γ をほぼ等量混合したもの(IFN混液: 終濃度IFN- β 8600 U/ml、IFN- γ 2400 U/ml)を用いて同様の実験を行った。結果を第3表に示す。

第 3 表

IFN	抗 血 清		抗ウィルス 活 性 (U/ml)
	抗IFN- β	抗IFN- γ	
IFN 混 液	-	-	19000
	○	-	930
	-	○	12000
	○	○	<27
IFN - γ c β	-	-	22000
	○	-	2400
	-	○	11000
	○	○	61

IFN- γ c β においても、それぞれ抗IFN

ーターの上流にあるPvu IIサイトをSal Iリンカーを用いてSal Iサイトに置き換えたあと、Sal IとBam HIで切断してヒトインターフェロン β の発現に必要な1.7 KbのDNA断片を分離した。

次に、pBR322から真核細胞での複製を阻害する配列を除いたベクターpML2d (H. Lusky et al, Nature, 293, 79, 1981)をSal IをBam HIで切断し長鎖断片を分離した。

これら2つのDNA断片をT4 DNAリガーゼを用いて結合しpSV β を得た。

B. ヒトインターフェロン β 発現ベクターpMTV β 作製:

上記A項で得られたpSV β を制限酵素Sal Iで切断後、Hind IIIリンカーを用いてSal IサイトをHind IIIサイトに置き換えたあと、Hind IIIで切断してSV40初期プロモーターを含まない3.8 KbのDNA断片を分離した。さらに、BAP (大腸菌アルカリフォスファターゼ)処理により末端のリンを除いた。

次に、MMTVプロモーターを含むベクターpMTVdhfr (F.lee et al, Nature, 294, 228, 1982) を制限酵素HindⅢで切断することによりMMTVプロモーターを含む1.4KbのDNA断片を分離した。

これら2つのDNA断片をT4DNAリガーゼを用いて結合することによりpMTVβを得た。

C. ヒトインターフェロンα発現ベクターpMTVαの作製:

pMTVαは、ヒトインターフェロンα遺伝子をMMTVプロモーターの支配下に置いたベクターである。作製方法は以下の通りである。

上記B項で得られたpMTVβをMMTVプロモーター下流にあるHindⅢサイトとヒトインターフェロン遺伝子の下流にあるBglⅡサイトで切断後、DNAポリメラーゼIKlenow断片処理で平滑末端化してから、MMTVプロモーターを含む3.9kbのDNA断片を分離した。

このDNA断片とpSV1FNα (特開昭61-52286) をDpnⅠ切断して得られるヒト

を得た。

E. ヒトインターフェロンαβ結合体動物細胞発現プラスミドpMTV(SV)αβの作製:

pMTV(SV)αβはpMTV(SV)αのヒトインターフェロンα遺伝子をヒトインターフェロンαβ結合体遺伝子に置き換えたベクターであって、次のようにして作製した(第13図参照)。

実施例1に従って得られたptrrp6hrIFN-αβの10μgをNdeⅠとDpuⅠで消化した後、アガロースゲル電気泳動により約1300bpのDNA断片を分取した。別に、前記D項により得られたpMTV(SV)αをBglⅡで消化した後、DNAポリメラーゼIKlenow断片処理により平滑末端を形成させ、さらにNdeⅠで消化してアガロースゲル電気泳動により約5100bpのDNA断片を分取した。それぞれのDNA断片を混合、T4DNAリガーゼにより連結し、pMTV(SV)αβを得た。

実施例10

ヒトインターフェロンαβ結合体動物細胞発

インターフェロンα遺伝子を含む0.8KbのDNA断片をT4DNAリガーゼを用いて結合することによりpMTVαを得た。

D. ヒトインターフェロンα発現ベクターpMTV(SV)αの作製:

pMTV(SV)αは、pMTVαのMMTVプロモーターの上流にSV40初期プロモーターを導入したベクターである。作製方法は以下の通りである。

上記C項で得られたpMTVαをSalⅠで切断後、DNAポリメラーゼIKlenow断片処理により平滑末端化してからBAP処理により末端のリンを除いた。

次に、pSV2IFNβ (特開昭61-52283) をPvuⅡとHindⅢで切断しSV40初期プロモーターを含む0.3KbのDNA断片を分離してから、DNAポリメラーゼIKlenow断片処理により平滑末端化した。

これら2つのDNA断片をT4DNAリガーゼを用いて結合することによりpMTV(SV)α

現プラスミドpMTV(SV)αcβの作製

pMTV(SV)αcβは、pMTV(SV)αのヒトインターフェロン^α遺伝子をヒトインターフェロンαcβ結合体遺伝子に置き換えたベクターであって、次のようにして作製した(第14図参照)。

実施例3に従って得られたptrrp6hrIFN-αcβの10μgをNdeⅠとDpuⅠで消化した後、アガロースゲル電気泳動により約1300bpのDNA断片を分取した。別に、実施例9のD項により得られたpMTV(SV)αをBglⅡで消化した後、DNAポリメラーゼIKlenow断片処理により平滑末端を形成させ、さらにNdeⅠで消化してアガロースゲル電気泳動により約5100bpのDNA断片を分取した。それぞれのDNA断片を混合、T4DNAリガーゼにより連結し、pMTV(SV)αcβを得た。

実施例11

pMTV(SV)αβによるPC12細胞の形質転換

第 4 表

実施例9に従って得られたpMTV(SV) γ - β 4 μ gとG418耐性遺伝子発現ベクターpSV2neo (J.Squith et al, J.Mol.Appl.Genet., 1, 327, 1982) 0.4 μ gとを、リン酸カルシウム法 (F.L.Graham et al, Virology, 54, 536, 1973)にて約 10^6 個のヒト肺癌由来PC12細胞 (H.Kinjo et al, Br.J.Cancer, 39, 15, 1979)に導入した。蛋白阻害剤G418 (GIBCO社)を400 μ g/mlの濃度で含む選択培地 (牛胎児血清10%とカナマイシン100 μ g/mlを含むRPMI1640培地 (日本製薬))にて培養したところ、24個の形質転換体を得た。

培養上清の抗ウイルス活性を、FL細胞-シンドビスウイルスを用いた実施例4に記載のCPE₅₀阻止法で測定したところ、22個に活性が認められた。活性測定の結果を第4表に示す。

以下 余 白

pMTV(SV) γ - β /PC12	
クローン	抗ウイルス活性 (U/ml)
1	18500
2	1100
3	600
4	1500
5	<80
6	1300
7	200
8	2300
9	200
10	<80
11	1000
12	2500
13	900
14	1400
15	500
16	400
17	<80
18	<80
19	300
20	800
21	200
22	900
23	200
24	1600

第 5 表

実施例12

pMTV(SV) γ - β によるPC12細胞の形質転換

実施例10に従って得られたpMTV(SV) γ - β 4 μ gとpSV2neo (実施例11参照) 0.4 μ gとを、実施例11に準じてリン酸カルシウム法にて約 10^6 個のPC12細胞に導入した。蛋白合成阻害剤G418 (GIBCO社)を400 μ g/mlの濃度で含む選択培地 (牛胎児血清10%とカナマイシン100 μ g/mlを含むRPMI1640培地 (日本製薬))にて培養したところ、26個の形質転換体を得た。

培養上清の抗ウイルス活性を、実施例11と同様にFL細胞-シンドビスウイルスを用いたCPE₅₀阻止法で測定したところ、20個に活性が認められた。活性測定の結果を第5表に示す。

pMTV(SV) γ - β /PC12	
クローン	抗ウイルス活性 (U/ml)
1	400
2	<60
3	<60
4	3800
5	1200
6	<60
7	6400
8	200
9	<80
10	400
11	200
12	900
13	500
14	700
15	<80
16	1300
17	21450
18	130
19	5300
20	1600
21	200
22	<80
23	1200
24	8600
25	300
26	500

〔発明の効果〕

以上のように、本発明は β 型インターフェロンと γ 型インターフェロンを暗号化する塩基配列を連結し、遺伝子操作の手法を用いて組換え体により、従来天然には存在しなかったインターフェロン結合体を生産させたものである。

本発明により得られたインターフェロン結合体は、従来 β 型インターフェロンあるいは γ 型インターフェロンそれぞれに担われていた作用を単独のポリペプチドで示すため、今までの単独のインターフェロンには見られなかった幅広い抗ウイルス作用スペクトルあるいは抗細胞増殖作用スペクトルなどの作用スペクトルを示すものである。すなわち既存のインターフェロンよりすぐれた抗ウイルス剤、抗腫瘍剤として使用することが可能である。

またインターフェロン結合体は、 β 、 γ 型インターフェロン混合物が示す相乗作用を一つのポリペプチドで示すため、分子あたりの活性が増大し今までのインターフェロンに見られない強力な作

用を持つこととなる。このように相乗作用を期待するためインビトロの実験では既存の β 、 γ 型インターフェロンを混合すればよいが、インビボではそれぞれの体内動態が異なり、目的の部位に必ずしも β 、 γ 型インターフェロン両者が存在しているとは限らない。インターフェロン結合体においては1分子で元の相乗作用を発揮しているため、このような体内動態の問題はおこらず期待される高い活性が発現される。すなわちインターフェロン結合体は既存のインターフェロン、あるいはその混合物より作用の高い抗ウイルス剤、抗腫瘍剤として利用できる。

また β 、 γ 型インターフェロン混合物を調製する際に、従来はそれぞれのポリペプチドを別々に調製しその後混合する必要があったが、本発明のポリペプチドであれば一度の調製で同じ効果を発揮できる。このようにして生産されたインターフェロン結合体はそのまま結合体ポリペプチドとしても使用できるし、必要に応じて連結部分を切り離して β 、 γ 型インターフェロン混合物としても

使用できる。いずれにしてもその調製の操作は、各々のインターフェロンを別々に調製する場合にくらべ簡略化されることになる。

4. 図面の簡単な説明

第1図は成熟ヒト β 型インターフェロンのアミノ酸配列の一例を、第2図は成熟ヒト γ 型インターフェロンのアミノ酸配列の一例を示す。第3図はヒト β 型インターフェロン発現プラスミドpKM6の構造を示し、第4図はヒト γ 型インターフェロン発現プラスミドp6hu γ -N1の構造を示す。第5図はヒト β 型インターフェロン構造遺伝子を取り出すためにxhoI部位を導入したプラスミドpKM6-cxhoの構造を示す。また第6図、第7図にはヒト γ 型インターフェロン構造遺伝子を取り出すために、それぞれKpnI、HlnPI部位を導入したプラスミドp6hu γ -N1-CKpn、p6hu γ -N1 Δ BS-NHlnの構造を示す。第8図はインターフェロン γ ・ β 結合体発現プラスミド作成の概要を、第9図はインターフェロン β ・ γ 結合体発現プラスミド作

成の概要を示す。第10図はインターフェロン γ ・ β 結合体発現プラスミド作成の概要を示す。第11図にはスパーサーペプチドのアミノ酸配列および暗号化する塩基配列を示す。第12図はインターフェロン β ・ γ 結合体発現プラスミド作成の概要を示す。

第13図はヒトインターフェロン γ ・ β 結合体動物細胞発現プラスミド作成の概要を示す。第14図はヒトインターフェロン γ ・ β 結合体動物細胞発現プラスミド作成の概要を示す。

- 1……ヒト β 型インターフェロン構造遺伝子
- 2……ヒト γ 型インターフェロン構造遺伝子
- 3……ヒト γ 型インターフェロンcDNAのポリペプチドを暗号化しない部分
- 4……SV40初期プロモーター
- 5……MMTVプロモーター
- 6……ヒト γ 型インターフェロンのシグナルペプチド配列

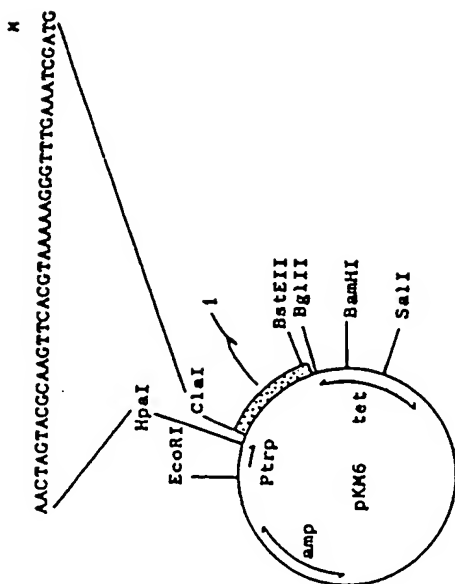
MET SER TYR ASN

LEU LEU GLY PHE LEU GLN ARG SER SER ASN PHE GLN CYS GLN LYS LEU LEU TRP GLN LEU ASN GLY ARG LEU GLU
 TYR CYS LEU LYS ASP ARG MET ASN PHE ASP ILE PRO GLU GLU ILE LYS GLN LEU GLN PHE PHE GLN LYS GLU ASP
 ALA ALA LEU THR ILE TYR GLU MET LEU GLN ASN ILE PHE ALA ILE PHE ARG GLN ASP SER SER THR GLY TRP
 ASN GLU THR ILE VAL GLU ASN LEU LEU ALA ASN VAL TYR HIS GLN ILE ASN HIS LEU LYS THR VAL LEU GLU GLU
 LYS LEU GLU LYS GLU ASP PHE THR ARG GLY LYS LEU MET SER SER LEU HIS LEU LYS ARG TYR TYR GLY ARG ILE
 LEU HIS TYR LEU LYS ALA LYS GLU TYR SER HIS CYS ALA TRP THR ILE VAL ARG VAL GLU ILE LEU ARG A^W PHE
 TYR PHE ILE ASN ARG LEU THR GLY TYR LEU ARG ASN

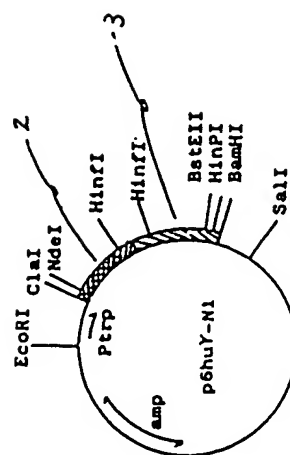
第 1 图

GLN-ASP-PRO-TYR-VAL-LYS-GLU-ALA-GLU-ASN-LEU-LYS-LYS-TYR-PHE-ASN-ALA-GLY-HIS-SER-ASP-VAL-
 ALA-ASP-ASN-GLY-THR-LEU-PHE-LEU-GLY-ILE-LEU-LYS-ASN-TRP-LYS-GLU-GLU-SER-ASP-ARG-LYS-ILE-MET-GLN-SER-
 GLN-ILE-VAL-SER-PHE-TYR-PHE-LYS-LEU-PHE-LYS-ASN-PHE-LYS-ASP-ASP-GLN-SER-ILE-GLN-LYS-SER-VAL-GLU-THR-
 ILE-LYS-GLU-ASP-MET-ASN-VAL-LYS-PHE-PHE-ASN-SER-ASN-LYS-LYS-LYS-ARG-ASP-PHE-GLU-LYS-LEU-THR-ASN-
 TYR-SER-VAL-THR-ASP-LEU-ASN-VAL-GLN-ARG-LYS-ALA-ILE-HIS-GLU-LEU-ILE-GLN-VAL-MET-ALA-GLU-LEU-SER-PRO-
 ALA-ALA-LYS-THR-GLY-LYS-ARG-LYS-ARG-SER-GLN-MET-LEU-PHE-ARG-GLY-ARG-ARG-ALA-SER-GLN

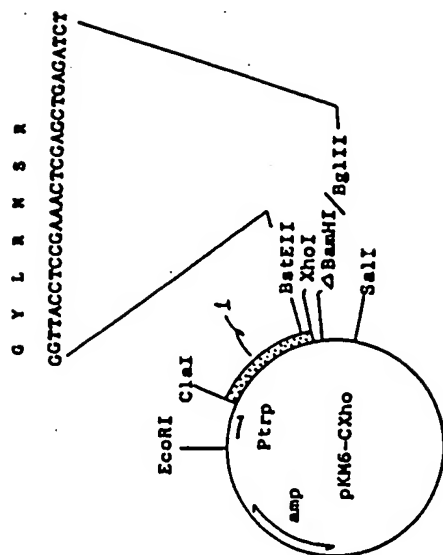
第 2 图



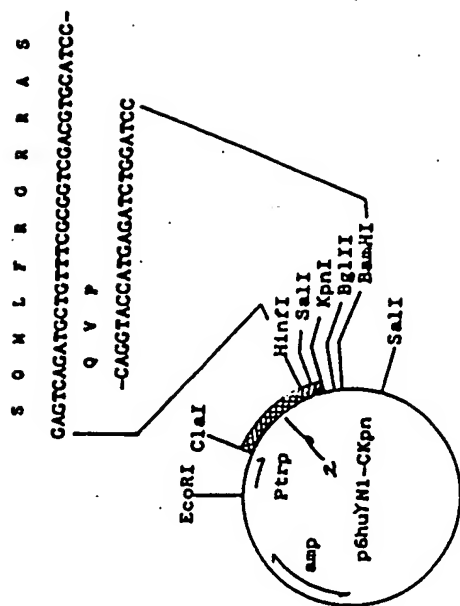
第 3 图



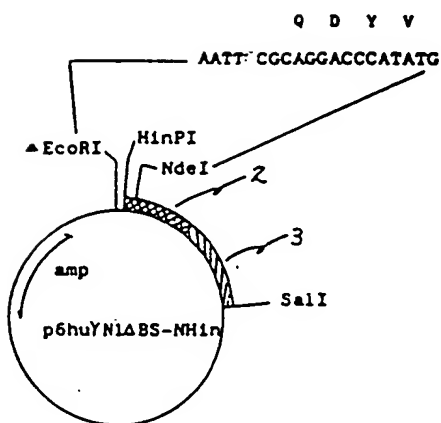
第 4 图



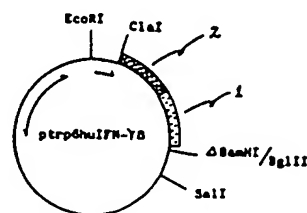
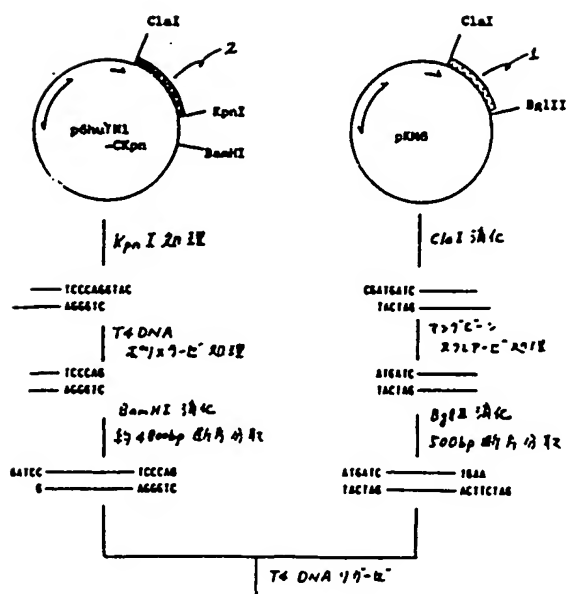
55



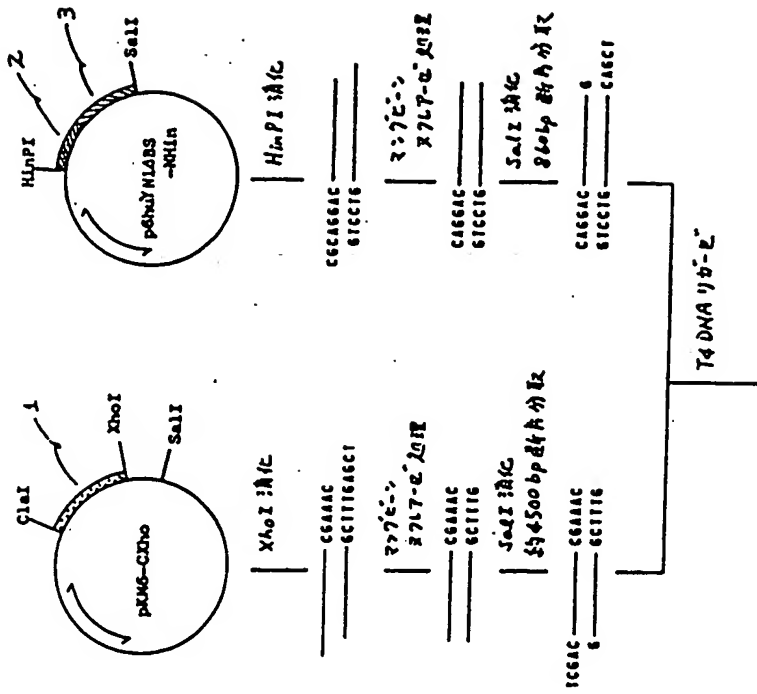
第 6 团



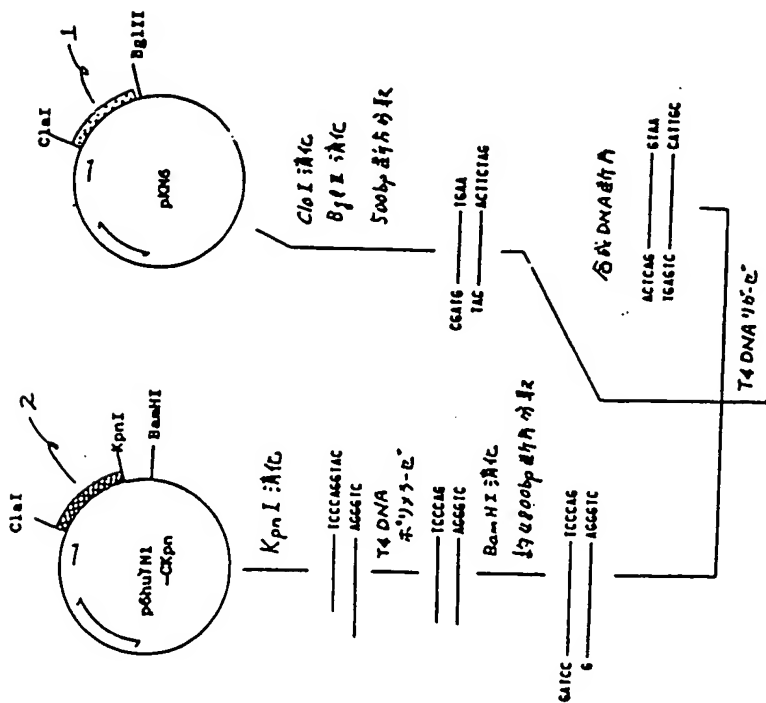
第 7 回



第 8 回



第9図

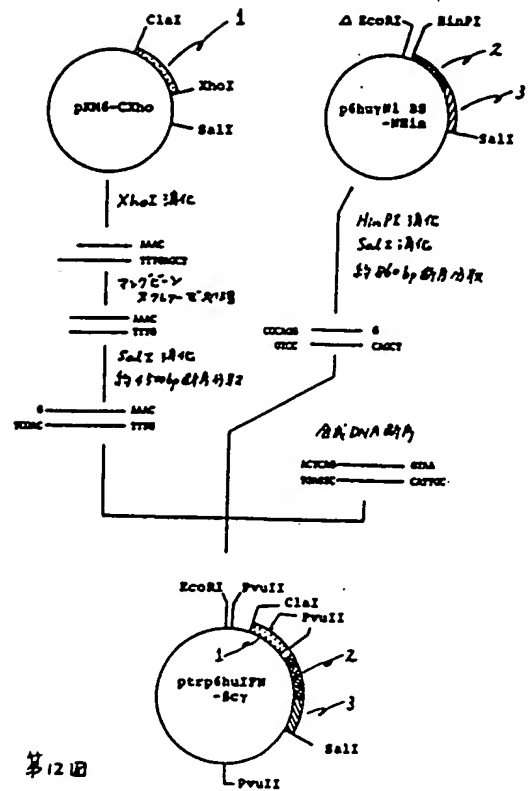


第10図

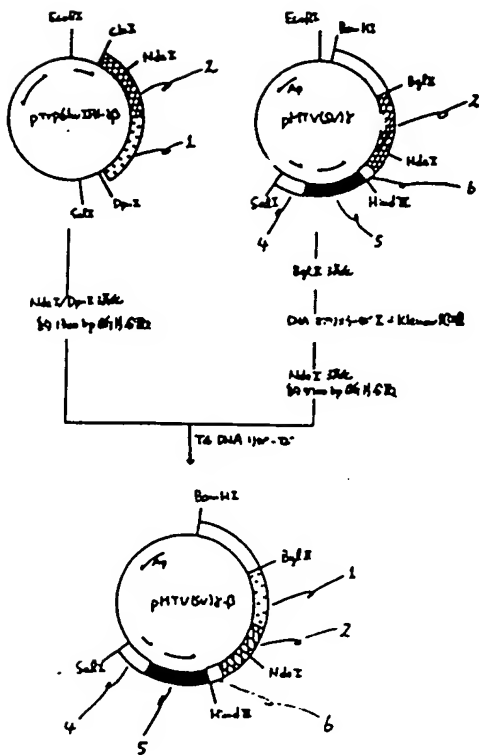


T Q L G O P K A A K S V T
 ACTCAGCTGGGCCAGCCGAAAGCTGCTAAGTCGGTAA
 TGAGTCGACCCGGTCGGCTTCGAGCATTGAGCCATTGC
 PvuII

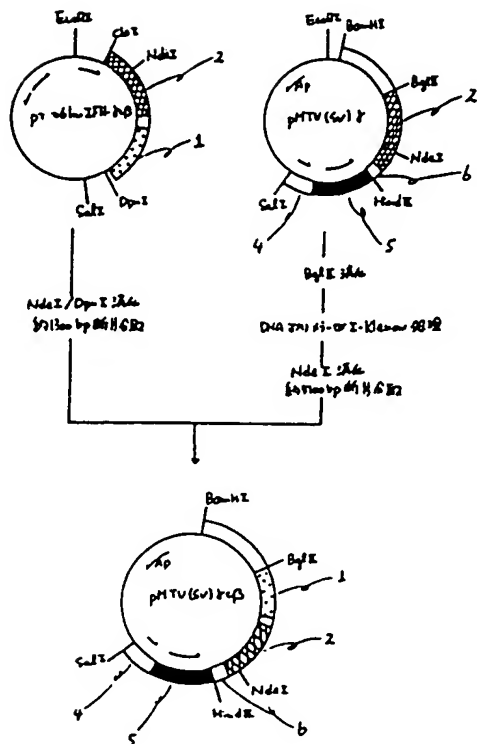
第11図



第12図



第13図



第14図

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.